

**PENGARUH KONSENTRASI EKSTRAK ETANOL DAUN SALAM
(*Syzygium Polyanthum*) TERHADAP HAMBATAN PERTUMBUHAN
BAKTERI *Enterococcus Faecalis* DOMINAN
DI SALURAN AKAR *IN VITRO***

NASKAH PUBLIKASI

Untuk Memenuhi Sebagai Persyaratan Mencapai Derajat Sarjana Kedokteran Gigi



Disusun Oleh :
Tiara Eka Saputri
J520110057

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA
2015**

LEMBAR PENGESAHAN

NASKAH PUBLIKASI

**PENGARUH LARUTAN KUMUR PROBIOTIK TERHADAP
PENINGKATAN pH SALIVA**

Yang diajukan Oleh:
Destya Mega Ratnasari
J520110038

Telah disetujui dan dipertahankan dihadapan dewan penguji skripsi
Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Surakarta,
pada hari Sabtu, tanggal 10 Januari 2015

Penguji

Nama : drg. Supriatno, M.Kes., MDSc., Ph.D

NIP : 196705131992031003

Pembimbing Utama

Nama : drg. Mahmud Kholifa, MDSc

NIK : 996

Pembimbing Pendamping

Nama : drg. SE Yuletnawati

NIK : 200.1294

Surakarta, 10 Januari 2015

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi UMS



(drg. Soetomo Nawawi, DPHdent, Sp. PERIO (K))

PENGARUH KONSENTRASI EKSTRAK ETANOL DAUN SALAM (*Syzygium Polyanthum*) TERHADAP HAMBATAN PERTUMBUHAN BAKTERI *Enterococcus faecalis* DOMINAN DI SALURAN AKAR *IN VITRO*

Tiara Eka Saputri¹, Mahmud Kholifa², S.E. Yuletnawati²

INTISARI

Enterococcus faecalis merupakan bakteri anaerob gram positif yang sering ditemukan pada lesi perapikal. Bakteri ini dikenal sebagai bakteri patogen yang sering menyebabkan terjadinya kegagalan perawatan saluran akar. Pemanfaatan bahan herbal sebagai antibakteri telah banyak digunakan masyarakat, salah satunya adalah daun salam (*Syzygium Polyanthum*) yang mengandung beberapa senyawa kimia yang berkhasiat sebagai antibakteri, antara lain tanin, flavonoid dan minyak atsiri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol daun salam (*Syzygium Polyanthum*) terhadap hambatan pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* dominan di saluran akar *in vitro*.

Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimental murni laboratorium dengan rancangan penelitian *post-test only control group design*. Metode yang digunakan adalah metode difusi yang terdiri dari 7 kelompok perlakuan, yaitu ekstrak etanol daun salam (*Syzygium Polyanthum*) dengan konsentrasi 2,5%, 5%, 10%, 20%, 40%, akuades steril sebagai kontrol negatif dan antibiotik amoxicillin sebagai kontrol positif. Masing-masing kelompok perlakuan direplikasi sebanyak 3 kali. Diameter zona hambat yang terbentuk kemudian diukur diukur menggunakan jangka sorong dengan tingkat ketelitian 0,02mm.

Analisis data dilakukan menggunakan uji ANOVA satu jalur ($p < 0,05$), kemudian dilanjutkan uji *post hoc* LSD. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun salam (*Syzygium Polyanthum*) dengan konsentrasi 2,5%, 5%, 10%, 20% dan 40% efektif dalam menghambat bakteri *Enterococcus faecalis* dominan di saluran akar *in vitro*.

Kata kunci: *Enterococcus faecalis*, Antibakteri, Ekstrak Etanol Daun Salam (*Syzygium Polyanthum*)

¹Mahasiswa Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Muhammadiyah Surakarta

²Dosen Pembimbing Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Muhammadiyah Surakarta

THE EFFECT OF BAY LEAF'S (*Syzygium Polyanthum*) ETHANOL EXTRACT CONCENTRATION AGAINST *Enterococcus faecalis* GROWTH, DOMINANT IN ROOT CANAL *IN VITRO*

Tiara Eka Saputri¹, Mahmud Kholifa², S.E. Yuletnawati²

ABSTRACT

Enterococcus faecalis is a Gram-positive anaerobic bacteria which usually found on periapical lesion. It is known as pathogenic bacteria often cause failure on root canal treatment. Herbs usage as an antibacterial agent has been widely applied by people, one of them is bay leaf (*syzygium polyanthum*), a herb contains chemical compounds that have antibacterial ability such as tannin, flavonoid and essential oil. This study was conducted to examine the effect of bay leaf's (*syzygium polyanthum*) ethanol extract concentration against *Enterococcus faecalis* growth dominant in root canal *in vitro*.

This study was carried by laboratory experiment with posttest only control group design. The method was disk diffusion method with 7 treatment groups, concentration of ethanol extract 2.5%, 5%, 10%, 20%, 40%, sterile aquades as negative control and amoxicillin as positive control. Each group was replicated 3 times. The diameter of the appeared inhibitory zone was measured using vernier caliper of 0.02 mm precision.

Data analysis was carried on one way ANOVA test ($p < 0.05$), followed by LSD post-hoc test. The result showed that ethanol extract of bay leaf (*syzygium polyanthum*) on 2.5%, 5%, 10%, 20%, and 40% concentration were effective to impede *enterococcus faecalis* growth dominant in root canal *in vitro*.

Keywords: *Enterococcus faecalis*, antibacterial, ethanol extract of bay leaf (*Syzygium Polyanthum*)

¹Student of Dentistry Faculty, Muhammadiyah University of Surakarta

²Lecturer of Dentistry Faculty, Muhammadiyah University of Surakarta

PENDAHULUAN

Salah satu bakteri yang sering ditemukan pada kasus kegagalan perawatan saluran akar adalah *Enterococcus faecalis*, yaitu sebesar 67%. *Enterococcus faecalis* merupakan bakteri anaerob gram positif, banyak ditemukan pada lesi perapikal dan merupakan bakteri paling resisten di dalam rongga mulut. Tingginya prevalensi *Enterococcus faecalis* disebabkan karena kemampuan bakteri tersebut dalam bertahan sebagai bakteri patogen di dalam saluran akar. Pada kasus infeksi endodontik, dibutuhkan antibiotik dengan spektrum bakterisid yang luas dalam melawan bakteri yang terdapat dalam saluran akar. Salah satu antibiotik yang sering digunakan adalah amoxicillin.¹ Namun, penggunaan antibiotik amoxicillin dalam jangka panjang dapat menimbulkan berbagai efek yang merugikan, antara lain xerostomia, nyeri atau sakit kepala, gangguan pada ginjal dan gangguan pada saluran pencernaan.² Oleh karena itu, peneliti ingin mencari bahan alternatif yang lebih aman dan memiliki efek samping yang lebih rendah dibandingkan obat-obatan kimia.

Tanaman salam merupakan tanaman obat tradisional yang berkhasiat sebagai antibakteri, antidiare, antioksidan, antihipertensi, antikolesterol dan antidiabetik.³ Bagian dari tanaman salam yang dapat dimanfaatkan sebagai obat tradisional adalah bagian daun, kulit batang, akar dan buah.⁴ Namun, bagian tanaman salam yang paling tinggi kandungan kimianya adalah pada bagian daun, yaitu mengandung senyawa tanin (21,7%), flavonoid (0,4%) dan minyak atsiri (0,05%) yang berkhasiat sebagai antibakteri.^{5 6}

Penelitian ini bertujuan untuk menguji kemampuan konsentrasi ekstrak etanol daun salam (*Syzygium Polyanthum*) sebagai bahan disinfeksi perawatan saluran

akar terhadap pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis in vitro*. Manfaat penelitian ini yaitu untuk memberikan tambahan informasi ilmiah mengenai pengaruh ekstrak etanol daun salam (*Syzygium Polyanthum*) terhadap pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* pada perawatan saluran akar, sebagai tambahan informasi bagi masyarakat luas mengenai pemanfaatan sumber daya alam sebagai bahan pengobatan tradisional dan dapat digunakan sebagai dasar penelitian lebih lanjut mengenai upaya pengembangan pengobatan tradisional.

Hipotesis penelitian ini bahwa ekstrak etanol daun salam (*Syzygium Polyanthum*) berpengaruh terhadap hambatan pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* dominan di saluran akar *in vitro* dan konsentrasi tertentu ekstrak etanol daun salam (*Syzygium Polyanthum*) memiliki efektivitas hambatan yang tinggi terhadap pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* dominan di saluran akar *in vitro*.

METODE PENELITIAN

Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimental murni laboratorium dengan rancangan *post-test only control group design*. Tempat penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan (FKH) Universitas Gadjah Mada (UGM) pada bulan Oktober 2014. Subjek yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun salam (*Syzygium Polyanthum*) dengan konsentrasi 5%, 10%, 20% dan 40% yang dibuat di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada (UGM).

Alat utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah jangka sorong. Alat penunjang yaitu almari pengering, alat penyerbuk, tabung Erlenmeyer, corong Buchner, vacuum rotary evaporator,

waterbath, neraca timbangan, digital ultraturax, vortex, ose, tabung reaksi, gelas ukur, kapas steril, lampu spiritus, cawan petri, mikropipet, spreader dan conical tube.

Bahan utama yang digunakan adalah ekstrak etanol daun salam (*Syzygium Polyanthum*) dan bakteri *Enterococcus faecalis*. Bahan penunjang adalah Media Brain Heart Infusion (BHI) cair, media Mueller Hinton Agar (MHA), etanol 70%, akuades steril dan antibiotik amoxicillin.

Prosedur pembuatan ekstrak daun salam adalah sebagai berikut : daun dicuci dengan air mengalir, ditimbang dikeringkan dan dihancurkan hingga menjadi serbuk. Serbuk daun salam diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan etanol 70%. Kemudian dilakukan filtrasi dengan corong Buchner dan dievaporasi menggunakan vacuum rotary evaporator sehingga didapatkan ekstrak kental. Ekstrak kental daun salam dilakukan pengenceran dengan konsentrasi 2,5%, 5%, 10%, 20% dan 40%.

Bakteri *Enterococcus faecalis* diambil dari biakan murni dengan ose steril dan ditanam pada media BHI kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37° C. Setelah diinkubasi, suspensi bakteri tersebut diencerkan dengan larutan garam fisiologis sampai kekeruhan bakteri sesuai dengan standar kekeruhan Brown III sehingga didapat konsentrasi larutan bakteri 10⁸ CFU/ml.

Uji difusi dilakukan dengan menyiapkan cawan petri yang telah diolesi bakteri *Enterococcus faecalis*, kemudian dibuat 7 lubang sumuran A, B, C, D, E, F dan G dengan diameter 6mm. Masing-masing lubang sumuran diberi perlakuan ekstrak etanol daun salam dengan konsentrasi 2,5%, 5%, 10%, 20%, 40%, akuades steril sebagai kontrol negatif dan antibiotik amoxicillin sebagai kontrol positif. Setelah diberi perlakuan, diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam. Diamati zona bening yang terjadi disekitar lubang sumuran, lalu dilakukan pengukuran zona

hambat menggunakan jangka sorong dengan ketelitian 0,02mm.

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini diolah dengan menggunakan SPSS 21.0 for windows. Data hasil penelitian ini dilakukan uji normalitas data dengan Shapiro-Wilk, kemudian dilanjutkan dengan uji homogenitas dengan Levene's test. Apabila data normal dan homogen, maka dilakukan uji statistik parametrik one way ANOVA dengan derajat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$), kemudian dilanjutkan dengan analisis uji *post hoc* LSD.

HASIL PENELITIAN

Penelitian mengenai pengaruh ekstrak etanol daun salam (*Syzygium Polyanthum*) sebagai bahan disinfeksi perawatan saluran akar terhadap bakteri *Enterococcus faecalis* dilakukan 3 kali replikasi untuk masing-masing variabel.. Setiap cawan petri dibuat 7 lubang sumuran dengan diameter 6 mm, kemudian ditetesi dengan ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum*) konsentrasi 2,5%, 5%, 10%, 40%, aquades steril sebagai kontrol negatif dan amoxicillin sebagai kontrol positif. Pengukuran diameter zona hambat dilakukan menggunakan jangka sorong dengan ketelitian 0,02mm.

Setelah didapatkan hasil data penelitian, kemudian dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas terlebih dahulu. Uji normalitas data dengan Shapiro-Wilk didapatkan taraf signifikansi sebesar 0,017 ($p < 0,05$), karena data tidak terdistribusi normal maka dilakukan uji transformasi data sehingga didapatkan uji Shapiro-Wilk dengan taraf signifikansi sebesar 0,453 ($p > 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa data terdistribusi normal. Selanjutnya dilakukan uji homogenitas dengan Levene's test untuk mengetahui apakah varian data homogen atau tidak. Hasil uji homogenitas didapatkan taraf signifikansi sebesar 0,497, karena nilai $p > 0,05$ maka varian data bersifat homogen.

Apabila data telah terdistribusi normal dan varian data bersifat homogen, maka dilanjutkan dengan uji statistik parametrik *one way* ANOVA. Hasil uji *one way* ANOVA menunjukkan nilai $p=0,00$ ($p<0,05$) yang berarti bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan. Pengolahan data dilanjutkan dengan uji *post hoc* LSD untuk mengetahui perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan. Hasil uji *post hoc* LSD menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan.

Tabel 1. Hasil uji *one way* ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,211	5	,042	198,126	,000
Within Groups	,003	12	,000		
Total	,214	17			

PEMBAHASAN

Penelitian mengenai pemanfaatan daun salam (*Syzygium Polyanthum*) sebagai bahan herbal pengobatan tradisional telah banyak dilakukan, terutama untuk mengobati penyakit maagh, diare dan diabetes. Sedangkan untuk penyakit pada rongga mulut, belum pernah dilakukan sebelumnya. Hasil penelitian ini menunjukkan adanya zona hambat disekitar sumuran yang telah diberi perlakuan ekstrak etanol daun salam (*Syzygium Polyanthum*) konsentrasi 2,5%, 5%, 10%, 20% dan 40%. Hal tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun salam (*Syzygium Polyanthum*) dengan konsentrasi 2,5%, 5%, 10%, 20% dan 40% memiliki daya antibakteri terhadap bakteri

Enterococcus faecalis. Hasil dari penelitian ini didapatkan daya antibakteri ekstrak etanol daun salam (*Syzygium Polyanthum*) tertinggi pada konsentrasi 40% yaitu sebesar 16,31 mm dan terendah pada konsentrasi 2,5% yaitu sebesar 8,92 mm. Hasil penelitian ini berbeda dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Malik dan Ahmad (2013) mengenai aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun salam (*Syzygium Polyanthum*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*, *Vibrio cholera* dan *Salmonella sp* dengan konsentrasi 10% sebagai konsentrasi yang paling efektif. Hal ini dapat disebabkan karena perbedaan bakteri dan metode yang digunakan dalam penelitian.

Hasil analisis data uji ANOVA satu jalur, menunjukkan perbedaan yang signifikan pada perlakuan ekstrak etanol daun salam (*Syzygium Polyanthum*) terhadap pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* dominan di saluran akar *in vitro*. Hasil uji *Post-Hoc* LSD test menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada diameter zona hambat yang terbentuk antar kelompok perlakuan ekstrak etanol daun salam (*Syzygium Polyanthum*) terhadap pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* dominan di saluran akar *in vitro*. Konsentrasi optimal ekstrak etanol daun salam (*Syzygium Polyanthum*) yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* dalam penelitian ini adalah 40%.

Dalam penelitian ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol daun salam (*Syzygium Polyanthum*), maka semakin tinggi pula daya hambat atau daya antibakteri yang terbentuk. Sedangkan pada kontrol negatif akuades steril, tidak memperlihatkan adanya zona hambat yang terbentuk di sekitar sumuran, yang berarti kontrol negatif akuades steril tidak memiliki daya antibakteri terhadap *Enterococcus faecalis*. Hal ini menunjukkan bahwa zona hambat yang terbentuk disekitar sumuran

disebabkan oleh adanya senyawa antibakteri yang terdapat dalam ekstrak etanol daun salam (*Syzygium Polyanthum*), termasuk senyawa tanin, flavonoid dan minyak atsiri.

Aktivitas antibakteri daun salam telah dibuktikan dengan adanya kandungan kimia berupa tanin, flavonoid dan minyak atsiri. Tanin bekerja sebagai zat antibakteri, secara garis besar mekanisme kerja tanin dipengaruhi oleh toksisitas tanin yang dapat merusak membran sel bakteri. Tanin juga dapat mengkerutkan dinding sel atau membran sel sehingga mengganggu permeabilitas sel bakteri. Akibat terganggunya permeabilitas, sel tidak dapat melakukan aktivitas hidup sehingga pertumbuhannya terhambat atau bahkan mati. Efek antibakteri tanin antara lain melalui: reaksi dengan membran sel, inaktivasi enzim, dan destruksi atau inaktivasi fungsi materi genetik.⁷ Mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri adalah menghambat enzim reverse transkriptase dan DNA topoisomerase sehingga sel bakteri tidak dapat terbentuk.⁸ Tanin juga memiliki aktivitas antibakteri yang berhubungan dengan kemampuannya dalam menginaktivasi adhesin sel mikroba juga menginaktivasi enzim, dan mengganggu transport protein pada lapisan dalam sel.⁹

Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri adalah membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membransel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler. Struktur dinding sel dan membrane sitoplasma bakteri menjadi tidak stabil karena struktur protein sel bakteri rusak, akibatnya fungsi permeabilitas sel menjadi terganggu dan sel bakteri akan mengalami lisis yang berakibat pada kematian sel bakteri.¹⁰ Selain berperan dalam inhibisi pada sintesis DNA –RNA dengan interkalasi atau ikatan hidrogen dengan penumpukan basa asam nukleat, flavonoid

juga berperan dalam menghambat metabolisme energi. Senyawa ini akan mengganggu metabolisme energi dengan cara yang mirip dengan menghambat sistem respirasi, karena dibutuhkan energi yang cukup untuk penyerapan aktif berbagai metabolit dan untuk biosintesis makromolekul.¹¹

Molekul hidrofobik penyusun minyak atsiri dapat menyebabkan perubahan permeabilitas membran dan kerusakan membran yang akhirnya menyebabkan kematian sel bakteri. Molekul minyak atsiri juga dapat mengganggu kerja enzim-enzim yang terikat pada membran sel, sehingga mengganggu aktivitas kerja pada membran sel.¹² Senyawa bisiklik seskuiterpen dialdehida pada minyak atsiri memiliki kemampuan mengubah fungsi membran dari protein integral sebagai senyawa aktif permukaan nonionik (surfaktan) dan membentuk derivatif pirol dengan kelompok amina primer fosfatidil etanol amin dan fosfatidilserin di lapisan luar membran plasma yang mengganggu kerja membran plasma, masuk ke dalam sitoplasma dan bereaksi dengan L-sistein yang terdapat didalam sitoplasma seperti pada glutation, protein dan alkohol dehydrogenase.¹³

KESIMPULAN

1. Ekstrak etanol daun salam (*Syzygium Polyanthum*) berpengaruh terhadap hambatan pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* dominan di saluran akar *in vitro*.
2. Konsentrasi 40% ekstrak etanol daun salam (*Syzygium Polyanthum*) merupakan konsentrasi yang paling efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* dominan di saluran akar *in vitro*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Wardhana, D.F., Rukmo, M., dan Budi, A.T. 2008. Daya Antibakteri kombinasi metronidazol, siprofloksasin dan minosiklin terhadap enterococcus faecalis. *Jurnal Ilmu Konservasi Gigi Unair* 1(1) : 23-28.
2. Tjay, T.H., dan Rahardja, K. 2007. *Obat-obat Penting, Khasiat, Penggunaan dan Efek Sampingnya*. Jakarta : PT. Elex Media Komputindo.
3. Malik, A., dan Ahmad, A.R. 2013. Antidiarrheal Activity of Etanolic Extract of Bay Leaves (*Syzygium Polyanthum* Wight). *Int. Res. J. Pharm.* 4(4) : 106-108.
4. Permadi, A. 2008. *Membuat Kebun TanamanObat*. Jakarta : Pustaka Bunda.
5. Sampurno., Djamaludin, M., Nuraini, A., Indriani, R., dan Ilyas, R. 2004. *Monografi Ekstrak Tumbuhan Obat Indonesia*. Jakarta : Badan POM RI
6. Sulastris, T. 2009. Analisis Kadar Tanin Ekstrak Air dan Ekstrak Etanol pada Biji Pinang Sirih (*Areca Catechu*. L). *Jurnal Chemica* vol 10 : 59-63.
7. Hasanah, NA., Nazaruddin F, Febrina ,E., dan Zuhrotun, A. 2011. Analisis Kandungan Minyak Atsiri dan Uji Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Rimpang Kencur (*Kaempferia galangal* L.). *Jurnal MIPA*. 16 (3) : 147-152
8. Nuria, M.C., Faizatun, A., dan Sumantri. 2009. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, dan *Salmonella typhi* ATCC 1408. *Jurnal Ilmu Pertanian* 5(2) : 26-37.
9. Akiyama, H., Fujii, K., Yamasaki, O., Oono, T., dan Iwatsuki K. 2011. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* (4) : 487-491.
10. Sukadana, I.M. 2009. Senyawa Antibakteri Golongan Flavonoid dari Buah Belimbing Manis (*Averrhoa carambola* Linn.L). *Jurnal Kimia*. 3 (2) : 109-116.
11. Roslizawaty., Ramadani, N.Y., Fakhurrazi., dan Herrialfian. 2013. Aktivitas Antibakterial Ekstrak Etanol dan Rebusan Sarang Semut (*Myrmecodia* sp.) Terhadap Bakteri *Escherichia coli*. *Jurnal Medica Veterinaria* 7(2) : 91-94
12. Jamal, Y., Irawati, P., Fathoni, A., dan Agusta, A. 2013. Chemical Constituents and Antibacterial Effect of Essential Oil of Javaneese Pepper Leaves (*Piper retrofractum* Vahl.). *Jurnal Penelitian dan Pengembangan Kesehatan* 23(2) : 32-38
13. Effendi, V.P., dan Widjanarko, S.B. 2014. Distilasi dan Karakterisasi Minyak Atsiri Rimpang Jeringau (*Acorus calamus*) dengan Kajian Lama Waktu Distilasi dan Rasio Bahan : Pelarut. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 2 (2) : 1-8.